

Dr hab. Wojciech Pokrzywa

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Igora Obuchowskiego

„Współpraca pomiędzy małymi białkami szoku cieplnego IbpA i IbpB w wiązaniu i późniejszej dezagregacji zdenaturowanych białek”

1. Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

W celu obrony proteomu przed warunkami proteotoksycznymi, komórka wykorzystuje mechanizm, który rozpoznaje częściowo rozwinięte i źle sfałdowane białka i promuje ponowne fałdowanie lub, w przypadku uszkodzenia końcowego, ich terminację. Dysfunkcja tego systemu umożliwia agregację białek zakłócając podstawowe procesy komórkowe i przyczyniając się do wielu chorób. Kluczowymi graczami w ochronie białek przed stresem są białka opiekuńcze (chaperony), które zapobiegają agregacji i kierują uszkodzone białka na ścieżki fałdowania lub degradacji. Temat podjęty przez Autora dotyczy małych białek szoku cieplnego (sHsp), które stanowią jedna z pierwszych linii obrony komórki przed natężeniem procesów agregacji białek. sHsp wiążą się z zagregowanymi substratami i wpływają na ich właściwości fizyczne co usprawnia dezagregację i ponowne fałdowanie za pośrednictwem białek opiekuńczych jak Hsp70. sHsp występują zarówno u prokariotów, jak i eukariotów, charakteryzując się np. stosunkowo niską masą cząsteczkową monomeru i zachowaną ewolucyjnie sekwencją aminokwasową. Co ciekawe, wraz z rozwojem organizmów oraz ich proteomu, sHsp zaczęły przyjmować dodatkowe funkcje.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest poniekąd kontynuacją badań Ratajczak i wsp. 2009, i ma na celu scharakteryzowanie mechanizmu współpracy dwóch bakteryjnych sHSP, - IbpA i IbpB, oraz ewolucji ich funkcji. Temat podjęty przez Autora jest ważny i aktualny, gdyż nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych sHsp dotyczących przeciwdziałania agregacji, oraz ich specjalizacji.

b) uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki

Autor podjął starania, aby rozróżnić mechanizmu działania IbpA i IbpB sHSP obecnymi w *Enterobacterales*. Uzyskane wyniki wykazały, że gen IbpA uległ duplikacji, a oba powstałe geny stały się funkcjonalnie rozbieżne. IbpA wyspecjalizował się w wydajnym wiązaniu substratu po agregacji (aktywność holdase), a drugi sHsp, IbpB, stał się kluczowy dla uwolnienia kompleksów sHsp przed etapem dezagregacji. Autor przanalizował skrupulatnie odpowiadające sHsp pochodzące z innych bakterii, celem porównania funkcjonalności systemów opartych tylko o IbpA lub oba białka IbpA/B. Co

ciekawe, system dwóch białek opiekuńczych sHsp pozwala na efektywniejsze modulowanie powinowactwa sHsp do substratów i zapewnia mniejsze zapotrzebowanie na białka opiekuńcze Hsp70 podczas dezagregacji i ponownego fałdowania. Może być to na przykład korzystne dla komórek funkcjonujących w długotrwałych warunkach stresowych, kiedy ogólne zapotrzebowanie proteomu na Hsp70 jest wysokie. Kolejny intrygujących rezultat badań prowadzonych przez Autora pokazuje, że obecność IbpA i IbpB jest konieczna dla kontrolowania procesu agregacji pewnej puli substratów jak dehydrogenaza jabłczanowa. Doktorant dokładnie przeanalizował swoją pracę badawczą i porównał ją z innymi raportami oraz podjął się dyskusji dotyczącej regulacji mechanizmu oraz funkcji IbpA i IbpB w utrzymaniu proteostazy komórkowej.

Wyniki dysertacji zostały opisane w renomowanym czasopiśmie naukowym o wysokim współczynniku oddziaływania (Plos Genetics, IF = 5.2). Dzięki istotnemu wkładowi w badania nad sHsp, Doktorant wziął udział w tworzeniu pracy przeglądowej na temat funkcjonowania sHSP w królestwie bakterii. Pan mgr Igor Obuchowski jest pierwszym autorem obu tych publikacji. Dodatkowo, Autor w czasie pracy doktorskiej uczestniczył w badaniach nad mechanizmem dezintegracji agregatów białkowych przez białko opiekuńcze Hsp70. Rezultaty tej pracy również zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, a mgr Igor Obuchowski był jednym ze współautorów.

Trzeba podkreślić, że artykuły wchodzące w skład rozprawy to prace bardzo wysokiej jakości. Znakomicie przygotowane, dobrze i klarownie napisane, zawierające dokładne i wnikliwe analizy biochemicznych i biofizycznych. Ryciny są starannie przygotowane, estetyczne i przejrzyste. Sukces publikacyjny wskazuje na wysoką jakość prezentowanych danych, a podczas procesu publikacji zostały one już pozytywnie zweryfikowane przez specjalistów.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Na wstępie chcę podkreślić, iż praca została napisana w języku angielskim, co było dobrą decyzją Autora. Mimo, iż Doktorant nie ustrzegł się błędów stylistycznych i interpunkcyjnych, rozprawa napisana jest klarownie oraz poprawnie pod względem formalno-językowym.

2. ocena metodologiczna

a) dobór literatury i umiejętność jej wykorzystania

Autor umiejętnie poprowadził wstęp oraz dyskusje z dostępnymi wynikami innych autorów, cytując adekwatne i aktualne prace, oraz wyciągając właściwe wnioski.

b) poprawność formułowania problemów badawczych

Wartość merytoryczna rozprawy nie budzi żadnych zastrzeżeń. Głównym celem badań prowadzonych było scharakteryzowanie mechanizmu współpracy białek E. coli IbpA i IbpB w procesach deagregacyjnych białkowych substratów. Doktorant logicznie sformułował powiązane hipotezy badawcze i z powodzeniem je udowodnił. Praca opiera się na przemyślanym i bardzo dobrze zaplanowanym i wykonanym cyklu doświadczeń. Jednocześnie wyniki uzyskane przez Autora stanowią ważny wkład do wiedzy na temat mechanizmów sHsp.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych

W badaniach własnych Doktoranta szacunek budzi szeroki wachlarz zastosowanych metod. W ich zakres wchodzi metody biochemii, biologii molekularnej i biofizyki, oraz obserwacje *in vivo*. Kluczowe eksperymenty opierały się na znanych metodach jak dynamiczne i statyczne rozpraszania światła w celu analizy agregacji badanych substratów, ale nie tylko. Autor skutecznie zoptymalizował nowoczesne metody jak Biolayer Interferometry (optyczna technika pomiaru oddziaływań makrocząsteczkowych) by śledzić oddziaływania sHsp i Hsp70. Nie mniej istotne jest odpowiednie wykorzystanie przez Autora podstawowych technik manipulacji kwasami nukleinowymi i białkami oraz ich wizualizacji jak metoda Western Blot. Podsumowując, Doktorant rozważanie i trafnie dobrał narzędzi badawcze.

Analiza filogenetyczna stanowiąca podstawę niektórych hipotez jest wykonana właściwie, ale opis samej metody mógłby być dokładniejszy. Na przykład, jak należy rozumieć zapis „*The positions with more than 10% of missing data were removed*”? Należałoby również wyjaśnić proces otrzymania MSA. „*To improve the overall quality of the concatenated alignment the 2 least complete or redundant taxa were now deleted*” - filtrowanie stałej liczby „niepożądanych” sekwencji może nie być optymalne, a nadmiarowość można dostosować, uruchamiając np. cd-hit na wszystkich sekwencjach w każdym OG. Rozumiem jednak, że Autor nie przeprowadzał samodzielnie analizy filogenetycznej, dlatego opis metody nie jest optymalny.

d) prawidłowość struktury pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa przedstawiona została na 84 stronach, podzielona na części, obejmujące: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, materiały i metody zastosowane w pracy, wyniki oraz dyskusję. Praca ma zatem prawidłowy układ i struktury podziału treści. Na podkreślenie zasługuje umieszczenie schematów eksperymentów, co zdecydowanie ułatwia analizę uzyskanych rezultatów. Powtórzenie numerów figur w części dyskusyjnej ułatwia czytelnikowi odwołanie się do eksperymentu, na podstawie którego dokonano interpretacji. Praca ma staranną szatę graficzną, poza figurą 3 i 4. Figura 3 jest słabo czytelna, sugerowałbym oznaczania obecnych tam obrazów jako a, b, c itd. Natomiast Figura 4 jest niskiej jakości, a obraz struktury na niej prezentowany dość wiekowy. Tu Autor mógłby pokusić się o wykorzystanie aktualnych narzędzi do wizualizacji struktury HSP16.5.

Podczas obrony chciałbym prosić Doktoranta o przedyskutowanie następujących kwestii:

i) Wydaje się, że istotnym zadaniem, które pozostaje w badaniach białek sHsp jest identyfikacja ligandów wiązanych specyficznie przez te białka *in vivo*. Chciałbym prosić Doktoranta o przedyskutowanie, jak można przeprowadzić taką identyfikację (być może badania takie są już opisane w literaturze)? Czy białka, które współczyszczają się z białkami lbpA i lbpB są również ich substratami czy białkami regulatorowymi? Czy można zaprojektować wysokoprzepustowe doświadczenia, oparte na innych metodach, w których w systematyczny sposób zbadane byłby białka z danego gatunku bakterii w kompleksach z możliwie kompletnym zestawem fizjologicznie istotnych partnerów/ligandów? Czy białka lbpA/B podlegają regulacjom posttranslacyjnym? Jeżeli tak, to jakim oraz jaka jest ich konsekwencja?

ii) Chciałbym również prosić Autora o przedyskutowanie powodu, dla którego białko IbpB mogło ewoluować w specyficznym gatunku bakterii? Dlaczego komórki wybiórczo utrzymują to zdarzenie genetyczne – tylko powód niższej funkcji dysocjacyjnej IbpA czy presja środowiskowa? Czy poziom/aktywność Hsp70 jest inaczej dostosowany/regulowany u organizmów z pojedynczym systemem IbpA? W jaki sposób IbpAEa pełni obie funkcje; *hold and dissociate*? Jaki może być wpływ badań Doktoranta na zrozumienie trudniejszych zagadnień związanych z sHSP u organizmów wyższych?

3. Ocena

Przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania naukowe na wysokim poziomie technicznym i merytorycznym. Stanowi ważny wkład w zrozumienie mechanizmu działania białek sHsp. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Igora Obuchowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy oraz sukces publikacyjny, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.